

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

betmar languages

rabic • Urdu • Swedish • Danish • German • French • Italian • Spanish • Japanese • Chinese • Russian • Dutch • Icelandic • Norwegian • Czech • Tagalog • Greek • Vietnamese • L

Patent Document No. 278 840

Title: The means of inhibiting adherence of the yeast *Candida albicans* to mucous membrane epithelia.

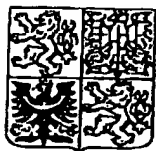
Abstract:

The means of inhibiting adherence of the yeast *Candida albicans* to mucous membrane epithelia, which includes a chitin-gluconic complex as an effective constituent, and which isolates the mycelia *Aspergillus niger* from the cellular wall. This means lowers the virulence of the yeast and could be used as a treatment and prophylaxis of vaginal colpitis. The means, according to this invention, uses a part of the waste mycelia *Aspergillus niger* from the manufacture of citric acid and contributes to resolving ecological problems.

PATENTOVÝ SPIS

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 664-92

(22) Přihlášeno: 05. 03. 92

(40) Zveřejněno: 13. 04. 94

(47) Uděleno: 25. 05. 94

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 13. 07. 94

(11) Číslo dokumentu:

278 840

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. 5:

A 61 K 31/715

A 61 K 35/72

(73) Majitel patentu:

Mikrobiologický ústav AVČR, Praha, CZ;

(72) Původce vynálezu:

Vraná Dagmar RNDr. DrSc., Praha, CZ;

Tomšíšková Alena prof. MUDr. DrSc., Plzeň,
CZ;

Kocna Adolf MUDr., Praha, CZ;

(54) Název vynálezu:

**Prostředek k inhibici adherence kvasinek
Candida albicans na slizniční epitel**

(57) Anotace:

Prostředek k inhibici adherence kvasinek *Candida albicans* na slizniční epitel, který obsahuje jako účinnou složku chitin-glukanový komplex, izolovaný z buněčné stěny mycelia *Aspergillus niger*. Prostředek snižuje virulenci kvasinek a mohl by být využíván při léčbě a profylaxi vaginálních kolpítid. Prostředek podle vynálezu využívá část odpadního mycelia *Aspergillus niger* z výroby kyseliny citrónové a přispívá tím k řešení ekologických problémů.

CZ 278 840 B6

Prostředek k inhibici adherence kvasinek *Candida albicans* na slizniční epitel

Oblast techniky

Vynález se týká prostředku k inhibici adherence kvasinky *Candida albicans* na slizniční epitel. Prostředek obsahuje účinnou složku, izolovanou z mycelia při výrobě kyseliny citrónové.

Dosavadní stav techniky

Je známou skutečností, že z vaginálních kolpitid je mykotická infekce tou nejčastější, nejčastěji vede k recidivám a je nejčastějším důvodem k návštěvě lékaře. Trvalé recidivy vedou navíc ke vzniku somatopsychických a psychosomatických poruch u pacientek. Invasivita patogenních kvasinek je podmíněna jejich schopností adherovat na buněčné stěny slizničních epitelů, která je realizována chemickou reakcí mezi komponentami buněčných stěn kvasinky a epitelie. Vznik této vazby je patrně molekulárně biologickým signálem pro změnu způsobu růstu kvasinky z ovoidní na vláknitou formu, která snadno proniká do hlubších vrstev napadeného orgánu (Krogh, Holmstrup, Vedtofte a Pindborg : A study of the yeast flora in human oral leukoplakia. IXth Internat. Spec. Symp. Yeasts "Yeasts in Human Environment", Smolenice 1983. Abstr. str. 62.). Adherenci kvasinek na lidské epitelie lze inhibovat např. aminocukry (Segal, Lehrer a Ofek : Adherence of *Candida albicans* to human vaginal epithelial cells: Inhibition by amino sugars. Exp. Cell Biol. 50, 13, 1982.).

Podstata vynálezu

Nový prostředek k inhibici adherence kvasinek *Candida albicans* na slizniční epitel, vyznačený tím, že obsahuje jako účinnou složku chitin-glukanový komplex z buněčných stěn mycelia *Aspergillus niger*. Prostředek využívá schopnosti chitinu (N-acetyl-glukosaminu) inhibovat adherenci patogenních kvasinek na epitelie lidských sliznic, čímž snižuje jejich virulenci. Získává se z buněčné stěny plísni, která obsahuje velké množství chitinu, tedy polymeru N-acetyl-D-glukosaminu s β -1-4 vazbami (Peberdy J.F.: Fungal cell walls. In: Biochemistry of cell wall and membrane in Fungi. Springer Verlag 1990, P.J.Kuhn, A.P.J. Trinci, M.S. Yung, M.W. Goosey, Eds.). Vzniká jako odpadní produkt při výrobě kyseliny citrónové pro potravinářské či farmaceutické potřeby, kdy odpadá velké množství mycelia produkční plísně *Aspergillus niger*, které je obtížným odpadem.

Chitin-glukanový komplex z mycelia provozního kmene *Asp. niger* z výroby kyseliny citrónové v závodě Lachema Kaznějov byl získán alkalickou hydrolysou 1 kg mokrého mycelia v 11 lN KOH, při teplotě 100 °C po dobu 1 hodiny, čímž byla odstraněna cytoplasma buněk i proteinová složka buněčné stěny. Pevný zbytek byl promýván do neutrální reakce a lyofilisován. Látka dává charakteristické IČ spektrum pro glukan 920, 891 a 774 a pro chitin 1618, 1379 a 781.

Získaný produkt byl v pokuse in vitro testován na schopnost inhibovat adhezenci virulentního kmene *C. albicans* (isolovaného v gynekologické ambulanci) na buňky lidské vaginální a bukalní sliznice a v pokusu in vivo na schopnost zabránit vzniku experimentální kandidosy u králičích samic.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Stanovení schopnosti chitin-glukanového komplexu inhibovat adhezenční aktivitu *Candida albicans* na buňky vaginální a bukalní sliznice in vitro.

Pokus proběhl ve 4 variantách:

- var.1: epitelie + *C. albicans* + chitin-glukan (vlastní pokus)
- var.2: epitelie + *C. albicans* + formalin (mrtvé kvasinky)
- var.3: epitelie + *C. albicans* + spec. antiserum (inaktivované kvasinky)
- var.4: epitelie + *C. albicans* + pufr (živé kvasinky)

Varianty 2, 3 a 4 byly trojnásobnou kontrolou.

Provedení pokusu:

- suspense A: 25 mg chitin-glukanu / 1 ml fosf. pufru, pH = 7
- suspense B: *C. albicans*, 24 hod. stará, vyrostlá na Sabouraudově agaru, suspendovaná ve fosf. pufru pH = 7, na hustotu 5 podle Mc Farlanda (Tomšíková A., Šandula J.: Imunologie a patogenita. V: Kvasinky ve výzkumu a praxi. Academia 1986, D. Vraná, Eds., str. 265.)
- suspense C: bukalní či vaginální slizniční epitelie, získané stěrem do fosf. pufru pH = 7, 3x promyté též puftrem a konečně do 1 ml téhož pufru resuspendované.

1 ml suspense A + 1 ml suspense B se smíchají a inkubují 24 hod. při 4 °C. Poté se 0,2 ml spojených suspensí (A + B) smísí s 0,2 ml promytých epitelii (suspense C) a inkubuje se za stálého třepání 90 min. Následuje filtrace přes membránový filtr Synpor 1 a promytí sedimentu na filtru 100 ml fosf. pufru pH = 7. Zhotoví se otiskový preparát na podložní sklo, po zaschnutí a fixaci plamenem se barví postupem podle Grama a mikroskopicky se hodnotí počet G⁺ kvasinek, dotýkajících se nebo ležících na G- epiteliiích nepravidelného tvaru.

V kontrolních variantách byl pro přípravu suspense B použit místo fosfátového pufru 0,9 % formalin (varianta 2) nebo specifické králičí antiserum (varianta 3). Mikroskopicky bylo hodnoceno 100 epitelii viz tabulka I.

Tab. I

epitelie	počet b. C. albicans na 1 epitelii			
	var. 1	var. 2	var. 3	var. 4
vaginální	1,18	2,99	3,74	21,07
bukální	2,70	4,90	6,20	16,40

- Vyhodnocení: 1. Různý počet buněk C. albicans na 1 epitelii v kontrolním pokuse (varianta 4) byl 20 násobkem počtu buněk v experimentu (varianta 1).
2. Buňky virulentní C. albicans adherují ve větší míře na buňky vaginálního než buňky bukálního epitelu.
3. Chitin-glukanový komplex z mycelia Aspergillus niger inhibuje adhezenci C. albicans na buňky vaginálního epitelu více než na buňky epitelu bu-
kálního.

Příklad 2

Stanovení schopnosti chitin-glukanového komplexu inhibovat adhezní aktivitu různých kmenů Candida albicans, izolovaných v gynekologické ambulanci, in vitro.

Stejný pokus byl proveden se 4 kmeny C. albicans, izolovanými od 4 pacientek. U těchto kmenů byla předem v kulturačních nádobách na Sabouraudově tekutém médiu stanovena specifická rychlost růstu μ a doba zdvojení buněčné hmoty g, aby mohl být posouzen vztah mezi rychlostí růstu a schopností adhezence. Růst byl stanoven podle optické density kultury v časovém intervalu 0-24 hod. Výpočet hodnoty μ byl proveden podle rovnice $\mu = X/t.1/X$. Hodnota g byla stanovena podle vzorce $g = 0,69/\mu$ (Beran a ost. : Růst a množení buněk. V: Kvasinky ve výzkumu a praxi. Academia 1986, D. Vraná, Ed., str. 169.). Výsledky udávají tabulky II a III.

Tab. II

kmen	% nárůst za 24 hod.	μ	g/hod
16/vag./	4,76	0,002	345,0
17/vag./	1825,92	0,120	5,75
18/vag./	1333,33	0,100	6,90
19/vag./	1196,62	0,106	6,50

Kmeny C. albicans od různých dárek se liší výrazně svými růstovými charakteristikami. Test schopnosti adhezence a inhibičního účinku chitin-glukanu byl uspořádán stejně jako v tab. I.

Tab. III

Kmen	počet b. C. albicans na 1 epitelii			
	var. 1	var. 2	var. 3	var. 4
16	1,54	1,66	2,0	11,96
17	0,84	2,24	2,68	22,56
18	1,44	3,96	1,9	20,86
19	1,18	1,66	0,86	15,95

Buňky pomalu rostoucího kmene (kmen 16) měly nižší adhezenční schopnost než buňky rychle rostoucích kmenů. Inhibiční účinek chitin-glukanu je u pomalu rostoucích buněk méně výrazný.

Příklad 3

Stanovení schopnosti chitin-glukanového komplexu zabránit vzniku experimentální vaginální kandidosy u králičích samic.

Schopnost chitin-glukanového komplexu zabránit vzniku experimentální kandidosy byla testována na králičích samicích, jimž byl do vaginy aplikován chitin-glukan spolu s virulentní C. albicans.

K pokusu bylo použito 21 králíků. Z virulentního kmene C. albicans byla připravena suspenze v destilované vodě podle McFarlandovy stupnice č. 10 a smísená s chitin-glukanem v poměru 1 : 1 (navážka chitin-glukanu 25 mg/1 ml fyziologického roztoku). 7 králíkům byla aplikována tato suspenze hluboko do pochvy 1x denně po dobu 7 dnů (skup. A). Dalších 7 králíků bylo infikováno samotnými C. albicans ve stejném časovém schématu (skup. B) a konečně posledním 7 experimentálním zvířatům byl stejným způsobem podáván pouze chitin-glukan (skup. C).

Po 7 dnech byly provedeny všem zvířatům výtěry z pochvy, které byly kultivovány 7 dnů na Sabouraudově médiu s glukózou (kontrolní výtěr byl u všech samic proveden před zahájením pokusu). Současně byly u všech zvířat provedeny kožní testy s manan-proteinem C. albicans.

V kontrolní skupině (skup. B) byl mykologický nález u všech zvířat pozitivní a samice trpěly výtokem. V pokusné skupině, v níž byl zvířatům spolu s infekčním agens současně podán chitin-glukan (skup. A), i v poslední skupině, kde byla zvířata ošetřena pouze chitin-glukanem (skup. C), byl mykologický nález negativní u všech samic. Kožní testy byly negativní u všech 21 zvířat, zařazených v pokuse.

Průmyslová využitelnost

Prostředek podle vynálezu by mohl poskytovat nástroj pro kombinovanou terapii a profylaxi vaginálních mykos.

CZ 278840 B6

Umožňuje likvidovat část odpadního mycelia *Asp. niger* z výroby kyseliny citrónové a přispívá tím k řešení ekologických problémů. Zavedení preparátu do léčebné praxe by znamenalo finanční úspory na nákup antimykotik v zahraničí.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Prostředek k inhibici adherence kvasinek *Candida albicans* na slizniční epitel, v y z n a č e n ý t í m, že obsahuje jako účinnou složku chitin-glukanový komplex z buněčných stěn mycelia *Aspergillus niger*.

Konec dokumentu

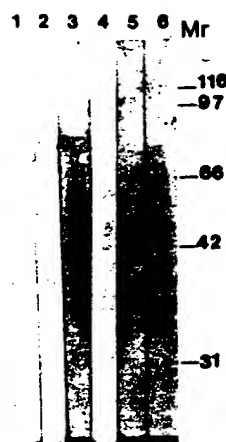


FIG. 4. Ligand blots with positive fractions from affinity chromatography. Reactions with C3(H₂O), C3b, iC3b, and C3d and controls with factor H or buffer containing marker proteins instead of any possible ligand: lane 1, factor H, stained with anti-H; lane 2, buffer control, stained with anti-C3c; lane 3, C3(H₂O), stained with anti-C3d; lane 4, C3d, stained with anti-C3d; lane 5, C3b, stained with anti-C3c; lane 6, iC3b, stained with anti-C3c.

phal forms. p42 was recognized by OKM-1, a monoclonal antibody against the alpha chain of the human iC3b receptor, CR3. It bound soluble C3(H₂O), C3b, and iC3b well, but bound only weakly to C3d. For these reasons, it is called p42-CR3. This designation of p42 is further supported by preliminary experiments showing a cross-reaction of the anti-p42-CR3 with human CR3 on U937 cells but not with CR2 on Raji cells. These data resulted from standard immunofluorescence assays comparing serum 42 with the preimmune serum (dilution, 1:500).

Upon treatment with neuraminidase, the molecular mass of p42 could not be reduced, suggesting that p42-CR3 does not contain sialic acid residues. Since endo F did not remove any carbohydrate either alone or in conjunction with neuraminidase, and Calderone et al. (3) used binding by concanavalin A as a criterion for purification of complement receptors from *C. albicans*, the lack of carbohydrate could be the reason for their failure to detect p42-CR3.

The antiserum against p42-CR3 typically precipitated two additional proteins of 55 and 66 kDa. p55-CR3 also reacted with C3(H₂O), C3b, and iC3b; furthermore, commercially available OKM-1 regularly detected p55 and occasionally detected p66, while OKM-1 obtained in our laboratory from a clone (CRL 8026; American Type Culture Collection, Rockville, Md.) always detected both proteins. Therefore, these proteins may be designated p55- and p66-CR3. By treatment with neuraminidase, p66-CR3 could be reduced to molecules of lower molecular mass (Fig. 3), including species of about 42 kDa. Because of these characteristics, p66-CR3 is probably a glycosylated form of p42-CR3, although the loss of protein after treatment with neuraminidase is not understood. A possible explanation might be that after loss of sialic acid, proteins become more sticky and are not completely transferred from the deglycosylation assay tube. In addition, it is conceivable that even after 20 h, many intermediate deglycosylation products which are distributed over a broad molecular mass range exist. These would not be detected even by Western blot because of the low concentration of each molecular mass species.

p55-CR3 upon neuraminidase treatment tended to form larger complexes that were less recognizable by the anti-p42-CR3 serum in Western blots. Some of these complexes seem to be similar to material obtained after 20 h of treatment of p66-CR3 with neuraminidase. p55 might be a protein related to p42, sharing some identical or cross-reactive epitopes. This could explain the absence of the 42-kDa species after the deglycosylation assay. The relationship of these three forms to molecules of 71, 68, 55, and 50 kDa identified by Ollert et al. (12) using a patient's serum is presently not clear.

During C3(H₂O)-Sephacryl absorption, a 70-kDa protein was also isolated (Fig. 1); an antiserum against it inhibited iC3b adherence. A protein of this size was also obtained by ion-exchange chromatography and inhibited iC3b adherence (data not shown). Since the anti-p42-CR3 serum never precipitated this molecular species, either it is a type different from p42, p55, and p66 or it has the same protein backbone but a higher degree of glycosylation covering the sites recognized by anti-p42-CR3.

Although p42-, p55-, and p66-CR3 do react with OKM-1 and show binding characteristics like those of human CR3, they obviously have a very different structure. While human CR3 has an alpha chain and a beta chain, in *C. albicans* CR3, a heterodimer was not observed. With p42-CR3 now available, the molecule's structure can now be clarified.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Hönlinger, F. Schinner, and E. Feifel for fermentation facilities and G. Kienast and M. Perfler for excellent technical assistance.

This work was supported by a grant from the BMWF, Vienna, Austria.

REFERENCES

1. Bokisch, V. A., M. P. Dierich, and H. J. Müller-Eberhard. 1975. Third component of complement (C3): structural properties in relation to functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:1989-1993.
2. Calderone, R. A., and P. C. Braun. 1991. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.* 55:1-20.
3. Calderone, R. A., L. Linehan, E. Wadsworth, and A. L. Sarnberg. 1988. Identification of C3d receptors on *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 56:252-258.
4. Edwards, J. E., T. A. Gaither, J. J. O'Shea, D. Rotrosen, T. J. Lawley, S. A. Wright, M. M. Frank, and I. Green. 1986. Expression of specific binding sites on *Candida albicans* with functional and antigenic characteristics of human complement receptors. *J. Immunol.* 137:3577-3583.
5. Eigentler, A., T. F. Schulz, C. Larcher, E.-M. Breitwieser, B. L. Myones, A. L. Petzer, and M. P. Dierich. 1989. C3bi-binding protein on *Candida albicans*: temperature-dependent expression and relationship to human complement receptor type 3. *Infect. Immun.* 57:616-622.
6. Gilmore, B. J., E. M. Retsinas, J. S. Lorenz, and M. K. Hostetter. 1988. An iC3b receptor on *Candida albicans*: structure, function and correlates for pathogenicity. *J. Infect. Dis.* 157:38-46.
7. Gitlin, J. D., F. S. Rosen, and P. J. Lachmann. 1975. The mechanism of action of the C3b inactivator (conglutinin-activating factor) on its natural substrate, the major fragment of the third component of complement (C3b). *J. Exp. Med.* 141:1221-1226.
8. Hamilton, A. O., L. Morrison, W. S. Kilpatrick, D. Lappin, J.-C. Bensa, D. W. H. Riches, and K. Whaley. 1984. Role of C3 in the control of monocyte C2 production. *Immunology* 51:169-176.

9. Hammer, C. H., G. H. Wirtz, L. Renfer, H. D. Gresham, and B. F. Tack. 1981. Large scale isolation of functionally active components of the human complement system. *J. Biol. Chem.* 256:3995-4006.
10. Heidenreich, F., and M. P. Dierich. 1985. *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*, in contrast to other *Candida* species, bind iC3b and C3d but not C3b. *Infect. Immun.* 50:598-600.
11. Linehan, W., E. Wadsworth, and R. Calderone. 1988. *Candida albicans* C3d receptor, isolated by using a monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 56:1981-1986.
12. Ollert, M. W., E. Wadsworth, and R. A. Calderone. 1990. Reduced expression of the functionally active complement receptor for iC3b but not for C3d on an avirulent mutant of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 58:909-913.